妊娠后期胎儿宫内生长受限对蒙古绵羊胎儿肝脏细胞外基质合成的影响

何　珊[1]　刘迎春[2,3]　李玲瑶[1]　梁　玮[1]　高　峰[1*]

（1.内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018；2.内蒙古农业大学生命科学学院，呼和浩特 010018；3.内蒙古生物制造重点实验室，呼和浩特 010018）

摘　要：本试验旨在研究妊娠后期胎儿宫内生长受限（IUGR）对蒙古绵羊胎儿肝脏细胞外基质合成的影响。选择健康的、经同期发情和受孕的蒙古绵羊 18 只，随机分为 3 组，代谢能水平分别为 0.175（R1 组）、0.330（R2 组）和 0.670 MJ/（kg $BW^{0.75}$·d）（自由采食组，C 组），每组 6 个重复，每个重复 1 只羊。妊娠 140 d 时屠宰母羊，测定胎儿肝脏实质细胞数量及细胞外基质含量。结果表明：R1 组胎儿肝脏重（P<0.01）、肝细胞数（P<0.05）、肝细胞核直径（P<0.01）以及Ⅰ型胶原（P<0.01）、Ⅲ型胶原（P<0.05）、Ⅳ型胶原（P<0.01）、层黏连蛋白（P<0.01）、透明质酸（P<0.05）、纤连蛋白含量（P<0.01）显著或极显著低于 C 组，且内皮细胞数显著高于 C 组（P<0.05）；R2 组胎儿肝脏重（P<0.05）、纤连蛋白含量（P<0.01）显著或极显著低于 C 组，而内皮细胞数显著高于 C（P<0.05）。结果提示，妊娠后期营养限饲蒙古绵羊严重限制其胎儿肝脏生长发育，代谢能水平为 0.175 MJ/（kg $BW^{0.75}$·d）时，胎儿肝脏细胞外基质合成受到了严重影响，且发生肝纤维化修复反应；代谢能水平为 0.330 MJ/（kg $BW^{0.75}$•d）时，仅有胎儿肝脏纤连蛋白含量发生改变。

关键词：营养限饲；胎儿肝脏；肝内实质细胞；细胞外基质

中图分类号：S826

宫内生长受限（intrauterine growth retardation,IUGR）又称胎儿生长受限（fetal growth restriction，FGR），指胚胎期自身体重或器官未达到遗传的生长潜能而导致胎儿及其器官生长发育迟缓[1]。IUGR 绵羊胎儿的肝脏不可避免地存在先天性不足，且显著影响肝脏后天的生长发育和生理功能[2]。肝脏作为机体功能性脏器，许多功能受细胞外基质（extracellular matrix,ECM）合成的影响[3]。ECM 在生物组织的构建、细胞极性的维持及胚胎发育、细胞

收稿日期：2016-03-09

基金项目：国家自然科学基金（31260559,31460612）；内蒙古自然科学基金杰出青年项目（2013JQ02）；内蒙古自治区青年创新人才项目-“草原英才”工程后备人才选拔计划

作者简介：何　珊（1987-），女，汉族，黑龙江牡丹江人，硕士研究生，从事反刍动物营养研究。E-mail: 15690992928@163.com

*通信作者：高　峰，教授，硕士生导师，E-mail: gaofeng1994@yahoo.com.cn（待更改）

分化都起到重要作用[4]。ECM 主要包括胶原蛋白Ⅰ型、胶原蛋白Ⅲ型、胶原蛋白Ⅳ型、透明质酸、层黏连蛋白、纤连蛋白等[5]。肝脏损伤导致 ECM 分泌减少，ECM 的代谢发生紊乱是肝纤维化发生的基础[6]；ECM 分泌变化导致的并发症常造成围产期或婴儿早期的死亡[7]。鉴于 ECM 对于肝脏疾病各个阶段都发挥重要作用，深入研究妊娠后期 IUGR 对于胎儿肝脏 ECM 合成影响有利于早期肝病的预防，提高出生率。本试验旨在研究妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿肝脏 ECM 合成的影响，为控制妊娠期胎儿肝脏 ECM 合成与降解处于平衡状态的研究和科学的母羊妊娠期饲养管理提供一定的理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验动物与饲养

选择体况中等、2～3 胎次，经同期发情和受孕(Medison-SA-600 B 超仪分析确定均为单胎)的健康蒙古绵羊 18 只，按体重随机分为 3 个组，代谢能水平分别为 0.175（限饲 1 组，R1 组）、0.330（限饲 2 组，R2 组）和 0.670 MJ/（kg BW$^{0.75}$·d）（自由采食组，C 组），每组 6 个重复，每个重复 1 只羊。采用自制人工套袋罩在各限制组母羊嘴部供青干草，适应 1 周后，按照设定饲喂量供给；C 组自由采食。所有试验羊 08:30、16:00 共饲喂 2 次；C 组 11:00 加喂 1 次以保证充分采食。各组自由饮水，自由舔食盐砖。每天采集采食饲草、剩草样，然后混合，供营养水平测定[8]。饲草及营养物质采食量、采食饲草及剩料的营养水平见表 1。

表 1　饲草及营养物质采食量、采食饲草及剩料的营养水平（饲喂基础）

Table 1　Intakes of grass and nutrients, and nutrient levels of fed grass and left grass　（as-fed basis）

项目 Items	组别 Groups			采食饲草	剩草
	R1	R2	C	Fed grass	Left grass
饲草采食量 Grass intake/（g/d）	444±8^{c}	853±21^{b}	1 693±30^{a}		
粗蛋白质采食量 CP intake/（g/d）	45±1^{c}	86±2^{b}	171±3^{a}		
代谢能采食量 ME intake/[MJ/(kg BW$^{0.75}$·d)]	0.175	0.330	0.670		
代谢能 ME/(MJ/kg)				8.71	
干物质 DM/%				88.42	92.04
粗蛋白 CP/%				10.09	9.27
粗脂肪 EE/%				4.34	2.72
中性洗涤纤维 NDF/%				71.98	71.19
酸性洗涤纤维 ADF/%				35.82	36.60
粗灰分 Ash/%				4.67	4.39

钙 Ca/%	0.57	0.68
磷 P/%	0.09	0.08

1.2 屠宰方法

妊娠 140 d 将每组 6 只母羊屠宰，母羊屠宰前，禁饲 24 h，禁水 15 h，称宰前活重。剥皮后沿腹中线开膛，取出胎儿，随即完整取出胎儿肝脏，称重，-80 ℃保存待测。

1.3 胎儿肝脏内实质细胞数量的测定

在肝门部切开肝脏，取最大切面处 1 cm×1 cm×1 cm 肝脏组织样本做成石蜡切块，用切片机做成切片，采用苏木精-伊红（HE）染色，利用专业图像分析软件 Image-pro Plus 6 进行肝细胞数、肝细胞核直径、内皮细胞数、枯否氏细胞数测定。

1.4 胎儿肝脏 ECM 的测定

取上述各组胎儿肝脏组织 0.5 g 左右，于 9 倍体积的 0.85%冷生理盐水匀浆，3 000 r/min 离心 15 min 后，取上清液，采用酶联免疫检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）测定胎儿Ⅰ型胶原（H142）、Ⅲ型胶原（H144）、Ⅳ型胶原（H145）、层黏蛋白（H148）和透明质酸（H141）含量，严格按照说明书测定各项指标。

1.5 数据处理

所有数据采用 SAS 9.0 一般线性模型统计分析，采用 Duncan 氏法进行多重比较。

2 结 果

2.1 妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿肝脏重的影响

妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿肝脏重影响见表 2。妊娠 140 d 时，R1 组胎儿体重、肝脏重极显著低于 C 组（P<0.01），且 2 组间肝脏重/体重差异不显著（P>0.05）；R2 组胎儿体重（P<0.01）、肝脏重（P<0.05）显著或极显著低于 C 组，且 2 组间肝脏重/体重差异不显著（P>0.05）。

表 2 妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿体重、肝脏重和肝脏重/体重的影响

Table 2 Effects of IUGR during late pregnancy on body weight, liver weight and liver weight/body weight in fetus of Mongolia sheep

项目 Items	组别 Groups			*P* 值 *P*-value
	R1	R2	C	
体重 Body weight/g	3 111.00±94.34^{e}	3 572.60±61.87^{c}	3 977.67±65.03^{a}	0.000 1
肝脏重 Liver weight/g	72.17±10.14^{c}	85.29±3.68^{b}	100.30±10.86^{a}	0.000 4
肝脏重/体重 Liver weight/body weight/%	2.31±0.09	2.44±0.16	2.52±0.10	0.475 1

同行数据肩标相同或无字母表示差异不显著（P>0.05），相邻字母差异显著（P<0.05），相间字母差异极显著（P<0.01）。

下表同。

In the same row, values with the same or no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05), while with adjacent letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05), and with alternate letter superscripts mean significant difference (*P*<0.01). The same as below.

2.2 妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿肝脏内实质细胞数量的影响

妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿肝脏内实质细胞数量的影响见表 3。妊娠 140 d 时，R1 组胎儿肝细胞数（*P*<0.05）、肝细胞核直径（*P*<0.01）显著或极显著低于 C 组，内皮细胞数显著高于 C 组（*P*<0.05），且 2 组间枯否氏细胞数差异不显著（*P*>0.05）；R2 组胎儿肝脏的内皮细胞数显著高于 C 组（*P*<0.05），且 2 组间肝细胞数、肝细胞核直径、枯否氏细胞数差异均不显著（*P*>0.05）。

表 3　妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿肝脏内实质细胞数量的影响

Table 3　Effects of IUGR during late pregnancy on parenchyma cell number in fetal liver of Mongolia sheep

项目 Items	组别 Groups			*P* 值 *P*-value
	R1	R2	C	
肝细胞数 Liver cell number/（个/cm³）	357.88±5.48^{b}	370.50±6.83^{ab}	377.58±3.50^{a}	0.082 4
肝细胞核直径 Liver cell nucleus diameter/μm	4.74±0.09^{c}	5.10±0.11^{ab}	5.26±0.07^{a}	0.007 4
内皮细胞数 Endothelial cell number/（个/cm³）	31.43±1.01^{a}	29.99±1.18^{a}	26.92±1.25^{b}	0.052 6
枯否氏细胞数 Kupffer Cells number/（个/cm³）	18.78±0.70	19.39±0.85	18.95±0.64	0.834 2

2.3 妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿肝脏 ECM 含量的影响

妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿肝脏 ECM 的影响见表 4。妊娠 140 d 时，R1 组胎儿肝脏Ⅰ型胶原（*P*<0.01）、Ⅲ型胶原（*P*<0.05）、Ⅳ型胶原（*P*<0.01）、层黏连蛋白（*P*<0.01）、透明质酸（*P*<0.05）、纤连蛋白含量(*P*<0.01)均显著或极显著低于 C 组；R2 组胎儿肝脏纤连蛋白含量显著低于 C 组(*P*<0.01)，但 2 组间Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、Ⅳ型胶原，层黏连蛋白、透明质酸含量差异均不显著（*P*>0.05）。

表 4　妊娠后期 IUGR 对蒙古绵羊胎儿肝脏细胞外基质含量的影响

Table 4　Effects of IUGR during late pregnancy on ECM contents in fetal liver of Mongolia sheep

项目 Items	组别 Groups			*P* 值 *P*-value
	R1	R2	C	
Ⅰ型胶原 CoLⅠ/(ng/mL)	35.77±1.17^{c}	38.48±1.17^{abc}	42.10±1.67^{a}	0.016 5
Ⅲ型胶原 COIⅢ/(ng/mL)	20.49±2.05^{b}	31.86±4.32^{a}	32.90±2.99^{a}	0.039 2
Ⅳ型胶原 COIⅣ/(ng/mL)	5.56±0.30^{c}	8.95±0.27^{a}	7.79±0.78^{a}	0.001 6
层黏连蛋白 LN/(ng/mL)	32.17±0.202^{c}	34.44±1.26^{abc}	36.98±1.47^{a}	0.025 9

透明质酸 HA/(ng/mL)	147.56±13.27^{b}	164.96a±17.78^{a}	161.77±12.14^{a}	0.401 3
纤连蛋白 FN/（ng/mL）	43.82±1.43^{c}	47.86±4.54^{c}	66.44±4.78^{a}	0.002 5

3 讨 论

机体正常生长发育表现为细胞的正常增殖，包括细胞数量、体积的增加。肝脏作为机体重要的内分泌器官，其基本的结构单位是肝小叶，肝小叶主要由肝细胞构成，占了肝小叶体积的 75%。除肝细胞外，肝小叶内的其他细胞统称血窦细胞，包括内皮细胞、肝巨噬细胞、大颗粒淋巴细胞和肝星状细胞等[9]。机体及其器官构成的基本单位是细胞，研究表明，IUGR 会严重影响胎儿体重和肝脏重量，导致细胞大小和细胞数量显著降低[10]；且母体营养受限会导致胎儿供给能量不足，体重和肝脏的生长、发育调节和生理功能不可避免地受到影响[2]。本试验条件下，严重限制了 R1 和 R2 组胎儿体重及肝脏重的增长，肝脏发育受阻这与高峰[11]报道的结果一致。随着营养水平的降低对胎儿肝脏组织细胞增殖和体积增大的影响逐步加深，可能是 IUGR 胎儿体重及肝脏重降低的主要原因[10,12-13]。R1 组胎儿肝细胞数、肝细胞核直径显著或极显著低于 C 组，表明妊娠后期 IUGR 绵羊胎儿肝细胞增殖能力降低，阻碍了细胞体积的增大，不同程度修改了胎儿肝脏的生长发育轨道[14]，可能是导致肝细胞数和体积降低的重要原因。另外，R1、R2 组内皮细胞数显著高于 C 组，肝代谢功能主要体现于肝细胞功能[15]，肝损伤时肝细胞、枯否氏细胞分泌内皮细胞特异性生长因子，促进肝窦内皮细胞增殖[16]。本试验结果表明，随着母体受限制程度加深胎儿肝脏结构与功能受到不同程度影响，且与张崇志[14]的研究结果一致。

ECM 不仅仅是支持组织,而且是供给营养和免疫应答的场所,适应外界环境和维持内部环境[17]。ECM 主要由肝细胞、内皮细胞合成分泌[3]，包括胶原蛋白（Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、Ⅳ型胶原）、蛋白多糖（透明质酸）、糖蛋白（层黏连蛋白、纤连蛋白）等[18]。胶原蛋白为生物体提供了一种机械支撑作用，维护器官与组织的完整性，保障其正常功能的行使[19]，且Ⅳ型胶原与层黏连蛋白共同构成基膜，起到 ECM 与外界进行物质交换作用[20]。透明质酸可以阻止细胞中一些酶的产生,减少自由基的形成,防止自由基破坏细胞结构[21]。层黏连蛋白在胚胎发育中发挥着决定性作用，其减少可能是某些疾病的发病基础[22]。且 ECM 成分与细胞生长和分化等多种细胞生命活动密切相关,对细胞的增殖与分化起着十分重要的调节作用[23]。本试验条件下，R1 组Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、Ⅳ型胶原、层黏连蛋白、透明质酸、纤连蛋白含量均显著或极显著低于 C 组，且 R2 纤连蛋白含量显著低于 C 组，表明妊娠后期营养限饲使胎儿肝细胞数减少，导致 ECM 合成降低[24]。层黏连蛋白在胚胎发育中起重要作用，维持细胞及器官形态，调节细胞增殖及分化，且主要由上皮细胞和内皮细胞合成，IUGR 导致肝脏内皮细胞数降低，可能是影响层黏连蛋白合成降低的重要原因[22]。ECM 及其组分的变化可能影响动物脂肪细胞体积、数量和

形态等方面的变化[23]，表明纤连蛋白是能量限制 ECM 合成中早期监控的重要指标。肝脏损伤会使 ECM 分泌降低，一方面营养限制导致 ECM 合成能力下降，另一方面，胎儿启动肝纤维化修复反应[25]。胎儿 ECM 降解大于合成能力，平衡被打破，且可能导致进一步纤维化[26]。肝实质细胞损害，通过旁分泌途径使肝细胞活化和增殖，形成肝纤维化[27]。肝纤维化与 ECM 分泌密切相关，本试验中，重度纤维化组织中层黏连蛋白含量升高不明显，可能由于机体修复能力降低所导致。层黏连蛋白的结果与张崇志[14]研究结果一致。

4 结 论

妊娠后期营养限饲蒙古绵羊严重限制其胎儿肝脏生长发育，代谢能水平为 0.175 MJ/（kg $BW^{0.75}$·d）时，胎儿肝脏 ECM 合成受到了严重影响，且发生肝纤维化修复反应；代谢能水平为 0.330 MJ/（kg $BW^{0.75}$ •d）时，仅有纤连蛋白发生改变。

参考文献：

[1] ELEFTHERIADES M,CREATSAS G,NICOLAIDES K.Fetal growth restriction and postnatal development[J].Annals of The New York Academy of Sciences,2006,1092:319–330.

[2] PETERSIDE I E,SELAK M A,SIMMONS R A.Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats[J].American Journal of Physiology:Endocrinology and Metabolism,2003,285(6):E1258-E1266.

[3] 杨川华,曾民德.肝脏细胞外基质与细胞的相互作用[J].国外医学:消化系疾病分册,1994,14(2):69–71.

[4] 金博,王立秋,李玉彬.细胞信号传递与细胞外基质降解简介[J].医学信息,1996,9(5):30-33.

[5] 刘超群,叶剑雄,金博.细胞外基质的构成[J].世界华人消化杂志,2002,10(1):53–54.

[6] 辛绍杰,邹正升.细胞外基质的代谢[J].世界华人消化杂志,2002,10(1):54–56.

[7] 刘金丽.层黏连蛋白研究进展[J].国外医学:皮肤性病学分册,2000,26(6):352–354.

[8] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].3版.北京:中国农业大学出版社,2007.

[9] 成令忠.组织胚胎学:人体发育和功能组织学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2003.

[10] GAO F,LIU Y C,HOU X Z.Effect of maternal undernutrition during late pregnancy on growth and development of ovine fetal visceral organs[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2009,22(12):1633–1639.

[11] 高峰.妊娠后期限饲母羊对其胎儿生长发育及出生后羔羊补偿生长的影响[D].博士学位论文.呼和

浩特:内蒙古农业大学,2006.

[12] KLIONSKY B,WIGGLESWORTH J S.Production of experimental models of foetal growth retardation by inhibition of DNA or protein synthesis[J].British Journal of experimental Pathology,1970,51(4):361–371.

[13] VAIMAN D,GASCOIN-LACHAMBRE G,BOUBRED F,et al.The intensity of IUGR-Induced transcriptome deregulations is inversely correlated with the onset of organ function in a rat model[J].PLoS One,2011,6(6):e21222.

[14] 张崇志.妊娠后期宫内生长限制对蒙古绵羊胎儿肝脏细胞凋亡及信号转导途径的影响[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2013.

[15] 成令忠.现代组织学[M].上海:上海科学技术文献出版社,1993:153–216.

[16] 贾一韬,曾民德.肝窦内皮细胞研究进展[J].国外医学:消化系疾病分册,2001,21(1):34–37.

[17] 许志强,刘平.细胞外基质的结构与功能[J].肝脏,1999,4(2):92–93.

[18] 陈金国.细胞外基质组份研究进展[J].国外医学:生理、病理科学与临床分册,1999,19(4):249–251.

[19] 张达江,王亮.Ⅰ型胶原蛋白的结构、功能及其应用研究的现状与前景[J].生物技术通讯,2006,17(2):265–269.

[20] 田鹤,张萍,郭敏.Ⅳ型胶原在胚胎小鼠肾脏发育过程中的表达[J].中国体视学与图像分析,2008,13(4):276–279.

[21] 潘红梅.透明质酸的研究现状综述[J].四川食品与发酵,2003,39(1):5–9.

[22] 蔡毅,黄松明.层黏连蛋白研究进展[J].国外医学:生理、病理科学与临床分册,1998,18(1):86–88.

[23] 孙超.ECM组分和cAMP对大鼠前体脂肪细胞增殖与分化的调控[D].博士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2001.

[24] 金博,李玉彬.细胞外基质的研究进展[J].医学理论与实践,1996,9(3):113–115.

[25] 胡义,王庆林.肝纤维化发病机制的研究进展[J].国际病理科学与临床杂志,2006,27(1):48–52.

[26] 王小众.肝纤维化的发病机制及抗纤维化研究进展[J].中西医结合肝病杂志,2001,11(S1):35–38.

[27] TAUB R.Liver regeneration:from myth to mechanism[J].Nature Reviews Molecular Cell Biology,2004,5(10):836–847.

Effects of Fetal Intrauterine Growth Retardation during Late Pregnancy on Extracellular Matrix Synthesis in Fetal Liver of Mongolia Sheep

HE Shan[1] LIU Yingchun[2,3] LI Lingyao[1] LIANG Wei[1] GAO Feng[1*]

(1. *College of Animal Science*, *Inner Mongolian Agricultural University*, *Hohhot* 010018, *China*; 2. *College of Life Science*, *Inner Mongolian Agricultural University*, *Hohhot* 010018, *China*; 3. *Inner Mongolia Key Laboratory of Bio-Manufacturing*, *Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: This study investigated the effects of fetal intrauterine growth retardation (IUGR) during late pregnancy on extracellular matrix synthesis in fetal liver of Mongolia sheep. Eighteen Mongolia sheep were allocated to three groups with 6 replicates per group and 1 sheep per replicate. Metabolizable energy (ME) level was 0.175 (R1 group), 0.330 (R2 group) and 0.670 MJ/（kg $BW^{0.75}$·d） (*Ad libitum* group, C group), respectively. At day 140 of gestation, ewes were slaughtered to determine parenchyma cell number and extracellular matrix contents in liver of their fetuses. The results showed that liver weight ($P<0.01$), liver cell number （$P<0.05$）, liver cell nucleus diameter ($P<0.01$), and the contents of collagen type Ⅰ（$P<0.01$）, collagen type Ⅲ（$P<0.05$）, collagen type Ⅳ （$P<0.01$）, laminin （$P<0.01$）, hyaluronic acid （$P<0.05$） and fibronectin （$P<0.01$） in fetal liver of R1 group were significantly lower than those of C group, and endothelial cell number in fetal liver was significantly higher than that of C group（$P<0.05$）; significantly higher fetal liver weight ($P<0.05$) and fibronectin content（$P<0.01$） were founded in R2 group compared to C group, and endothelial cell number in fetal liver were greatly enhanced in R1 group compared to C group （$P<0.05$）. The results indicate that nutrition restriction during late pregnancy of Mongolia sheep restricts growth and development of fetal liver, and a serious impact on the synthesis of extracellular matrix is found when ME level is 0.175 MJ/（kg $BW^{0.75}$•d）, and liver fibrosis repair reaction also occurs; only the change of fibronectin content in liver fetal is found when ME level is 0.330 MJ/（kg $BW^{0.75}$•d）.

Key words: nutrition restriction; fetal liver; liver parenchyma cell; extracellular matrix

---

*Corresponding author, professor, E-mail: gaofeng1994@yahoo.com.cn (责任编辑　王智航)